

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Монаховой Майи Викторовны
на тему: «Белки MutS и MutL: межмолекулярные взаимодействия на
начальных этапах репарации «мисматчей» в ДНК»
по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (химические науки)**

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Монаховой М.В. посвящена изучению белков MutS и MutL, играющих ключевые роли в системе репарации неканонических пар нуклеотидов в ДНК (MMR, от англ. mismatch repair). Система MMR узнает и исправляет «ошибки», допущенные ДНК-полимеразой в процессе репликации, тем самым поддерживая стабильность генома. Нарушение функционирования MMR приводит к накоплению мутаций, которые могут стать причиной развития онкологических заболеваний. На сегодняшний день многие детали процесса MMR остаются невыясненными. Исследования затрудняются динамической структурой ключевых белков системы MutS и MutL, образования ими большого количества конформаций. Таким образом, изучение свойств белков MutS и MutL и их комплексов с ДНК является актуальным.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Монаховой М.В. изложена на 168 страницах, имеет классическую структуру: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы, который включает 287 источников. Текст работы иллюстрирован 67 рисунками и содержит 13 таблиц.

Во «Введении» Монахова М.В. обосновывает актуальность проблемы исследования и оценивает степень ее разработанности, отмечая, что открытие связи между онкологическими заболеваниями и MMR обуславливает необходимость выявления деталей её функционирования. Система MMR характеризуется высокой консервативностью первичной структуры ключевых белков MutS и MutL от бактерий до высших эукариот и

есть основания предполагать, что основные механизмы репарации «мисматчей» сходны для всех организмов. Тем не менее, актуальность разработки новых подходов к изучению свойств белков MutS и MutL и их комплексов с ДНК во многом обусловлена конформационной подвижностью данных белков, сильно ограничивающей возможности их исследования существующими методами. Автором перечислены основные «темные пятна» в работе системы MMR, в частности путь передачи сигнала о наличии «мисматча» к месту гидролиза ДНК, особенности строения комплекса MutS-MutL-ДНК, недостаток данных о функционировании бактериальных MutL с эндонуклеазной активностью и др.

На основании представленных выше рассуждений Монахова М.В. формулирует цели и задачи работы, оценивает научную новизну и практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор посвящен описанию системы репарации «мисматчей» в ДНК, соответствует заявленной тематике работы, и его основные разделы тесно связаны с исследованиями, которые проводил диссертант. Монаховой М.В. достаточно подробно изложены имеющиеся в литературе данные об особенностях функционирования MMR в различных организмах, рассмотрены существующие модели активации процесса. Во второй части литературного обзора соискателем рассмотрены строение и свойства двух ключевых белков процесса репарации «мисматчей» – MutS и MutL.

При проведении экспериментов использованы современные методы биохимии и молекулярной биологии: методы молекулярного клонирования, различные виды хроматографии, химическая модификация ДНК, флуоресцентные методы, работа с клеточными культурами и выделение рекомбинантных белков, биоинформатические методы.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из нескольких частей. Первая часть посвящена подробному описанию белков MutS и MutL из

различных организмов, которые являлись объектами исследования, а также их мутантных форм. Также в этом разделе соискатель описывает впервые выделенный белок MutL из бактерии *Rhodobacter sphaeroides* и биоинформатическими методами предсказывает его эндонуклеазную активность.

Следующий раздел посвящён изучению основных биохимических свойств полученного белка MutL из *R. sphaeroides* в сравнении с ранее описанным MutL из *Neisseria gonorrhoeae*. Охарактеризованы основные функции белков: эндонуклеазная, АТФазная и ДНК-связывающая. Показано, что выбранные белки обладают схожими свойствами.

Основным методом для изучения ДНК-белковых взаимодействий выбран метод ковалентной фиксации белков на ДНК. В работе предложено три типа новых модифицированных ДНК, с помощью которых выяснялись особенности функционирования белков системы репарации MMR, чему посвящена большая часть обсуждения результатов. В качестве ДНК-реагента на остатки Arg белков впервые предложены модифицированные ДНК, содержащие β-дикетогруппу при С2'-атоме углеводного фрагмента. Показана способность таких соединений реагировать с остатками Arg белков MutS и MutL из *Escherichia coli*. В работе получены ДНК, содержащие акриламидную группу, и продемонстрировано их эффективное взаимодействие с Cys белка MutS из *E. coli*. Также с помощью этих реагентов удалось продемонстрировать новое, ранее не описанное, конформационное состояние MutS из *E. coli*. Используя ДНК с пиридилдисульфидной группой при С5-атоме dU удалось уточнить контакты белков MutL из *E. coli* и *N. gonorrhoeae* с ДНК. Также Монаховой М.В. впервые разработан метод выделения активного «сшитого» комплекса MutS–ДНК. Методом флуоресцентного резонансного переноса энергии продемонстрировано, что такой комплекс способен эффективно связывать MutL, что может свидетельствовать в пользу стационарной модели активации MMR.

Научная новизна и достоверность результатов исследования

Достоверность полученных в результате работы выводов не вызывает сомнения. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, полностью обоснованы. Содержание автореферата отражает все основные результаты, полученные Монаховой М.В. Результаты работы опубликованы в 7 статьях в российских и международных рецензируемых научных журналах, а также представлены на различных международных и российских конференциях.

К диссертационной работе есть ряд вопросов и замечаний.

1. Безусловным достижением автора является клонирование и выделение нового белка MutL из *Rhodobacter sphaeroides*. Однако, несмотря на подбор условий, выход белка был небольшим, что сильно ограничило возможности его изучения. Есть ли в планах дальнейшая оптимизация условий выделения и очистки? Можно ли что-то предпринять для получения большего количества белка?
2. Для анализа ДНК-связывающей активности белков ngMutL и rsMutL (раздел IV.2.3.) автором были выбраны ДНК-дуплексы (дцДНК) длиной 16, 20, 30, 41, 76 п.н. В выбранных условиях не удалось зафиксировать комплексообразование rsMutL с ДНК, и характеристика ДНК-связывающей активности была проведена для белка ngMutL. Были ли попытки проверить более длинные ДНК-дуплексы в отношении выделенного автором нового белка rsMutL?
3. В разделе IV.4.1.2. («Кросслинкинг» между различными мутантными формами esMutL и модифицированными ДНК, содержащими пиридилдисульфидную группу) автор сначала показала, что количество конъюгата не зависит от концентрации АТФ в реакционной смеси (рис. 39), а затем в качестве оптимальных условий использовала 0°C, буфер Т и 100 мкМ АТФ. Для какой цели нужен АТФ?
4. В разделе 4.1.4. (Влияние белка esMutS на образование конъюгатов esMutL–ДНК) вместо введенных автором esWTMutS и esCFMutS иногда использовано общее обозначение esMutS.

5. Работа написана хорошим научным языком, однако есть несколько опечаток, в том числе в химических названиях, и технических ошибок:
- в списке сокращений есть далеко не все сокращения, используемые автором в тексте диссертации;
 - циклогексидкарбодиимид вместо дицилогексилкарбодиимида (стр. 54, второй абзац снизу);
 - на подписи к рисунку 19 перепутаны названия 2-пиридилдисульфидной и акриламидной групп, эта же опечатка присутствует на рис 3 в автореферате;
 - в таблице 7 не обозначен дуплекс 8;
 - в последнем абзаце на странице 99 в тексте $ecMutL(N131C)$, а на рис 40 $ecMutL(T131C)$;
 - на странице 105 автор пишет «В данной работе было показано эффективное комплексообразование как $ecWTMutS$, так и $ecCFMutS$ со всеми тремя модифицированными 59-звенными ДНК-дуплексами независимо от длины линкера (рис. 44).», но на рисунке 44б для $ecWTMutS$ показано взаимодействие только с двумя ДНК-дуплексами;
 - в разделе IV.4.2.1. перепутаны номера рисунков;
 - в таблице 10 не приведены выходы конъюгатов 4 и 8;

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Монахова Майя Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (химические науки).

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений

Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук

Хандажинская Анастасия Львовна

20.11.2023

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

1.5.3. – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных
соединений

Подпись Хандажинской А.Л. удостоверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН

Бочаров А.А.